



⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 196 19 255 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 196 19 255.2
㉑ Anmeldetag: 13. 5. 96
㉒ Offenlegungstag: 28. 11. 96

㉓ Int. Cl.⁸:
C 07 K 7/08
C 07 K 7/08
A 61 K 38/08
A 61 K 38/10
C 12 N 5/08
G 01 N 33/53

DE 196 19 255 A 1

③① Innere Priorität: ③② ③③ ③①
17.05.95 DE 195181190

⑦① Anmelder:
Link, Hartmut, Prof. Dr., 30625 Hannover, DE;
Khatab, Barbara, Dr., 30625 Hannover, DE

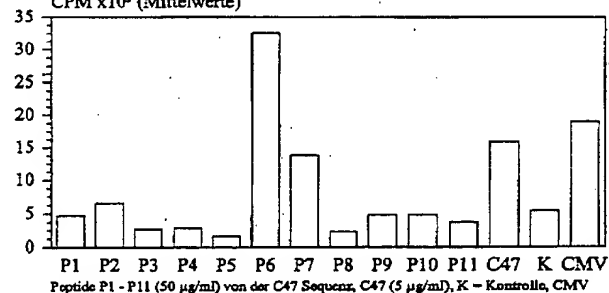
⑦④ Vertreter:
Patentanwälte Dr. Boeters, Bauer, Dr. Meyer, 81541
München

⑦② Erfinder:
gleich Anmelder

⑤④ Hexadekameseres Peptid, Vakzine, Herstellungsverfahren und Verwendung

⑤⑦ Die Erfindung betrifft die Identifizierung des Peptides C47-6 vom Matrixprotein pp65 (HCMV pp65) des humanen Cytomegalievirus (HCMV) als Immunogen und beinhaltet den Einsatz des Peptides C47-6 oder Teilsequenzen vom Peptid C47-6 in einem Impfstoff gegen HCMV, den Einsatz bei einer adoptiven Immuntherapie der HCMV-Infektion oder zur diagnostischen Bestimmung der HCMV-spezifischen Immunreaktivität.

HLA-Haplotyp von Spender Nr. 1: A 1,3; B 8,35; DR 1,3; DQ 1,2
CPM x10³ (Mittelwerte)



DE 196 19 255 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNESDRUCKEREI 10. 98 602 048/497

11/29

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Identifizierung des Peptides C47-6 des Matrixproteins pp65 vom humanen Cytomegalievirus als Immunogen zum Einsatz in einem Impfstoff gegen HCMV, zum Einsatz bei einer adoptiven Immuntherapie der HCMV-Infektion oder zur diagnostischen Bestimmung der HCMV-spezifischen Immunreaktivität.

1.1. Stand der Forschung

Das humane Cytomegalievirus (HCMV) ist ein in unserer Bevölkerung weit verbreitetes Virus. Bis zu einem Lebensalter von 30 Jahren hat sich fast jedes zweite Individuum mit diesem Virus infiziert. Bei gesunden, in der Immunabwehr kompetenten Individuen verläuft die primäre HCMV-Infektion in der Regel asymptomatisch und bleibt daher meistens unerkannt. Die HCMV-Infektion hat jedoch eine große Bedeutung für Menschen mit kompromittierter Immunitätslage wie z. B. im Laufe einer immunsuppressiven Therapie nach Organ- oder Knochenmarktransplantation, bei Tumor- und Leukämiepatienten, Polytransfunden sowie AIDS-Patienten. Weiterhin stellt die HCMV-Infektion eine große Gefahr für den Embryo oder Fötus durch die physiologisch bedingte Immunsuppression von Schwangeren als auch für Neugeborene, deren Immunsystem bei Geburt noch nicht vollständig differenziert ist, dar. Die Häufigkeit einer pränatalen oder kongenitalen Infektion beträgt weltweit durchschnittlich 1%. Auch Fehlgeburten im ersten Trimester sind auf HCMV-Infektionen zurückzuführen. Ob sie aber vermehrt bei HCMV-infizierten Schwangeren im Vergleich zu nicht-HCMV-infizierten Schwangeren auftreten, wird strittig diskutiert (1). Ein Impfstoff gegen das humane Cytomegalievirus ist zur Zeit noch nicht verfügbar.

Für eine protektive Immunantwort gegen das humane Cytomegalievirus wird vornehmlich die HCMV-spezifische zelluläre Immunantwort der humoralen Immunantwort übergeordnet (2,3,4). Sowohl HCMV-spezifische CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten (CD8⁺ CTL) als auch CD4⁺ T-Helfer-Zellen (CD4⁺ T_H) sind die essentiellen Effektorzellen (5, 6).

Nach heutigem allgemeinen Wissensstand ist die antigenspezifische zelluläre Immunantwort dichotom aufgliedert:

- A. CD4⁺ T-Helfer-Zellen (T_H) erkennen spezifisch ein Antigen-Epitop, das ihnen in Assoziation mit HLA (human leucocyte antigen) Klasse II-Molekülen auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen präsentiert wird, und werden zur Proliferation stimuliert. Sie unterstützen folgende Funktionen: 1. die Generierung antigenspezifischer CD8⁺ zytotoxischer T-Zellen (CTL), 2. die Generierung antigenspezifischer B-Zellen der humoralen Immunantwort für die Produktion von spezifischen Antikörpern, 3. die Produktion antiviraler Zytokine. 4. Für einige Antigene wie z. B. das Masernvirus sind auch spezifische, HLA Klasse II restringierte CD4⁺ CTL beschrieben worden, die virusinfizierte Zellen lysieren können (7).
- B. CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (CTL) erkennen spezifisch ein Antigen-Epitop, das ihnen in Assoziation mit HLA Klasse I-Molekülen auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen präsentiert wird und lysieren direkt virusinfizierte Zellen.

CD4⁺ T-Helfer-Zellen als auch CD8⁺ CTL werden aus peripheren mononukleären Blutzellen gewonnen.

Kurze, lineare Peptide, die als Antigene den antigenpräsentierenden Zellen exogen hinzugefügt werden, können direkt an unbesetzte Stellen von HLA-Molekülen sowohl der Klasse I als auch der Klasse II binden und somit T-Zellen aktivieren. Die Mehrzahl von Peptiden, die mit HLA Klasse I-Molekülen assoziieren, ist in der Regel 8 bis 10 Aminosäuren lang. Peptide, die mit HLA Klasse II-Molekülen assoziieren, haben in der Regel eine Länge von 10 bis 34 Aminosäuren (8).

Es sind verschiedene HCMV-Proteine identifiziert worden, die als Antigene für die zelluläre Immunantwort gegen HCMV verantwortlich gemacht wurden. Die viralen Regulatorproteine immediate early-Antigen 1 [pUL123] und 2 [pUL122] (9,10,11,12), das MHC-Klasse-I-Homolog [gpUL18] (12), die Glycoproteine gB [gpUL55] (13,14,15, 16, 17) und gH [gpUL75] (18) sowie die internen Strukturproteine der Virusmatrix pp71 [ppUL82] (12) und pp65 [ppUL83] (18,19,20) konnten eine Proliferation peripherer mononukleärer Blutzellen oder von CD4⁺ T_H-Zell-Linien im Lymphozytenproliferationstest stimulieren. Eine spezifische CD8⁺ CTL-Antwort ist bislang für die Proteine pp65 [ppUL83] (21,22,23), pp150 [ppUL132] (21), immediate early-Antigen 1 [pUL123] (9, 10,21), gB [gpUL55] (15) und das MHC-Klasse-I-Homolog [gpUL18] (24) beschrieben worden.

1.2. Literatur zum Stand der Forschung

- (1) Zytomegalie I und II (1988). Behringwerke, Medizinische Information Nr. 230747 und Nr. 230748
- (2) Gehrz, R.C., Marker S.C., Knorr S.O. et al. (1977). Lancet 2, 844.
- (3) Gehrz, R.C. Linner, K.M. Christianson, W.R. et al. (1982). Clin. Exp. Immunol. 47, 27.
- (4) Zaia, J.A. (1994). Chapter 28. Cytomegalovirus infection. in: Bone Marrow Transplantation; Forman, S.J., Blume, K.G. and Thomas, E.D., eds.; Blackwell Scientific Publications, pp. 376—403.
- (5) Reusser, P., Riddell, S.R., Meyers, J.D. & Greenberg P.D. (1991). Blood 78, 1373—1380.
- (6) Li, Ch.-R., Greenberg, P.D., Gilbert, M.J., Goodrich J.M. & Riddell, S.R. (1994). Blood 83, 1971—1979.
- (7) van Binnendijk, R.S., Versteeg-van Oosten, J.P.M., Poelen, M.C.M., Brugghe, H.F., Hoogerhout, P., Osterhaus, A.D.M.E. & Uytendaele, F.G.C.M. (1993). Journal of Virology 67, 2276—2284.
- (8) Chicz, R.M. & Urban, R.G. (1994). Immunology Today 15, 155—160.
- (9) Rodgers, B., Borysiewicz, L., Mundin, J., Graham, S. & Sissons, P. (1987). Journal of General Virology 68,

2371—2378.

- (10) Alp, N.J., Allport, T.D., van Zanten, J., Rodgers, B., Sissons, J.G.P. & Borysiewicz, L.K. (1991). *Journal of Virology* 65, 4812—4820.
- (11) Davignon, J.-L., Michelson, S. & Davrinche, C. (1993). in: *Multidisciplinary approach to understanding cytomegalovirus disease*; Michelson, S. and Plotkin, S.A., eds.; Elsevier Science Publishers B.V., pp. 139—144. 5
- (12) He, H., Rinaldo, C.R. & Morel, P.A. (1993). in: *Multidisciplinary approach to understanding cytomegalovirus disease*; Michelson, S. and Plotkin, S.A., eds.; Elsevier Science Publishers B.V.; pp. 333—337.
- (13) Liu, Y.-N. C., Kari, B. & Gehrz R.C. (1988a). *Journal of Virology* 62, 1066—1070.
- (14) Liu, Y.-N. C., Eckhardt, J., Kari, B. & Gehrz, R. C. (1988b). *International Journal of Cell Cloning* 6, 352—364.
- (15) Liu, Y.-N. C., Klaus, A., Kari, B., Stinski, M.F., Eckhardt, J. & Gehrz R.C. (1991). *Journal of Virology* 65, 1644—1648. 10
- (16) Liu, Y.-N. C., Curtsinger, J., Donahue, P.R., Klaus, A., Opitz, G., Cooper, J. Karr, R.W., Bach, F.H. & Gehrz, R.C. (1993). *Journal of General Virology* 74, 2207—2214.
- (17) Curtsinger, J.M., Liu, Y.-N. C., Radeke, R., Bryon, M.K., Fuad, S., Bach, F.H. & Gehrz, R. C. (1994). *Journal of General Virology* 75, 301—307. 15
- (18) Beninga, J., Kropff, B. & Mach, M. (1995). *Journal of General Virology* 76, 153—160.
- (19) Forman, S.J., Zaia, J.A., Clark, B.R., Wright, C.L., Mills, B.J., Pottathil, R., Racklin, B.C., Gallagher, M.T., Welte, K. & Blume K.G. (1985). *Journal of Immunology* 134, 3391—3395.
- (20) Lolli, F., Sundqvist, V.-A., Castagna, A., Ljungman, P., Linde, A., Andersson, G., Olsson, T. & Wahren, B. (1993). *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 7, 55—62. 20
- (21) Riddell, S.R., Gilbert, M.J., Li, C.-R., Walter, B.A. & Greenberg, P.D. (1993). in: *Multidisciplinary approach to understanding cytomegalovirus disease*; Michelson, S. and Plotkin, S.A., eds.; Elsevier Science Publishers B.V.; pp. 155—164.
- (22) Gavin, M.A., Gilbert, M.J., Riddell, S.R., Greenberg, P.D. & Bevan, M.J. (1993). *Journal of Immunology* 151, 3971—3980. 25
- (23) McLaughlin-Taylor, E., Pande, H., Forman, S.J., Tanamachi, B., Li, C.-R., Zaia, J.A., Greenberg, P.D. & Riddell, S.R. (1994). *Journal of Medical Virology* 43, 103—110.
- (24) Wronska, D., Jones, J., Browne, H., Wilkinson, G., Minson, A.C., Sissons, J.G.P. & Borysiewicz, L.K. (1993). in: *Multidisciplinary approach to understanding cytomegalovirus disease*; Michelson, S. and Plotkin, S.A., eds.; Elsevier Science Publishers B.V.; pp. 321—326. 30

2. Eigene Arbeiten

Aufgabe der Erfindung ist es, immunogene Sequenzen von T-Zell-Epitopen innerhalb des Matrixproteins pp65 (HCMV pp65) des humanen Cytomegalievirus (HCMV), die eine Proliferation von peripheren mononukleären Blutzellen bewirken, zu identifizieren und auf einen minimalen Bereich einzugrenzen, um die besagten immunogenen Sequenzen von T-Zell-Epitopen in HCMV pp65 als hochspezifische Komponenten in einem Impfstoff gegen das humane Cytomegalievirus oder im Sinne einer adoptiven Immuntherapie zur Expansion epitopspezifischer T-Zellen zur Prävention von HCMV-Infektionen oder zur diagnostischen Bestimmung der HCMV-spezifischen Immunreaktivität einzusetzen. Diese Aufgabe wird durch die Gegenstände der Ansprüche gelöst. 40

Die Gegenstände der Erfindung betreffen bzw. sind gerichtet auf

1. auf den therapeutischen und diagnostischen Einsatz des Peptides C47-6 vom Matrixprotein pp65 des humanen Cytomegalievirus (HCMV) mit folgenden Eigenschaften: 45

- 1.1. Molekular: Peptid von HCMV pp65-Protein,
- 1.2. Grob-Lokalisation: im C-terminalen Bereich innerhalb des HCMV pp65-Proteins, Stamm AD169 (Aminosäure 1 bis einschließlich Aminosäure 561) im Sequenzbereich ab Aminosäure 477 bis einschließlich Aminosäure 561 des HCMV pp65-Subfragmentproteins C47 (Aminosäure 389 bis einschließlich Aminosäure 561), der nicht von den HCMV pp65-Subfragmentproteinen C74 (ab Aminosäure 297 bis einschließlich Aminosäure 458) und C35 (ab Aminosäure 303 bis einschließlich Aminosäure 476) abgedeckt wird,
- 1.3. Fein-Lokalisation: Das Protein pp65 von HCMV (Stamm AD 169) ist 561 Aminosäuren lang. Die Aminosäuresequenz des immunogenen Peptides C47-6 innerhalb von pp65 beginnt einschließlich ab Aminosäure 509 und endet mit einschließlich Aminosäure 524, 55
- 1.4. chemische Natur des Fragmentes: Peptid, aus Aminosäuren zusammengesetzt,
- 1.5. Länge: 16 Aminosäuren,
- 1.6. Funktion: induziert die HCMV-spezifische Proliferation von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC), 60
- 1.7. Identifizierung der Sequenz und Funktion: experimentell wie beschrieben,
- 1.8. Auflistung der Aminosäuresequenz des Peptides C47-6 (ab Aminosäure 509 bis einschließlich Aminosäure 524) im 1-Buchstaben-Code:

KYCEFFWDANDIYRIF 65

2. auf einen Impfstoff (Vakzine) gegen das humane Cytomegalievirus, in dem die Sequenz des Peptides C47-6 aus Anspruch 1 enthalten ist und als Immunogen eingesetzt wird, um die Proliferation humaner

peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) zu induzieren,

3. auf einen Impfstoff (Vakzine) gegen das humane Cytomegalievirus, in dem Teilsequenzen des Peptides C47-6 aus Anspruch 1 enthalten sind, die als Immunogene eingesetzt werden, um die Proliferation humaner peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) zu induzieren,

4. auf die Zusammensetzung eines Impfstoffes (Vakzine) gegen das humane Cytomegalievirus nach Anspruch 1, 2. und 3. für Individuen mit den HLA-Klasse I und II Haplotypen: HLA-A1, HLA-B8, HLA-DR3 und HLA-DQ2,

5. auf die ex vivo Anzüchtung und Expansion HCMV-spezifischer T-Zellen aus mononukleären Zellen von allogenen oder autologen Spendern mit der Sequenz des Peptides C47-6 oder Teilsequenzen des Peptides C47-6 aus Anspruch 1, 2, 3. und 4. als Immunogen, um Peptid C47-6-spezifische T-Zellen im Sinne einer adoptiven Immuntherapie einer HCMV-Infektion einzusetzen,

6. auf die Zusammensetzung eines Immunogens für die adoptive Immuntherapie einer HCMV-Infektion nach Anspruch 1, 2, 3, 4. und 5. bei Individuen mit den HLA-Klasse I und II Haplotypen: HLA-A1, HLA-B8, HLA-DR3 und HLA-DQ2.

7. auf den diagnostischen Einsatz des Peptides C47-6 oder Teilsequenzen des Peptides C47-6 zur Bestimmung der HCMV-spezifischen Immunreaktivität.

Nachstehend wird die Erfindung beispielhaft näher erläutert:

Tabelle 2 zeigt eine spezifische Stimulation von peripheren mononukleären Blutzellen durch Peptid C47-6 bei den Spendern Nr. 1, 2 und 3 (Auflistung der cpm-Mittelwerte von mit den Peptiden C47-1 bis C47-11 behandelten Kulturen, Mediumkontrolle und HCMV-stimulierten Kulturen);

Abb. 1 zeigt eine graphische Darstellung der spezifischen Stimulation von PBMC durch Peptid C47-6 bei Spender Nr. 1;

Abb. 2 zeigt eine graphische Darstellung der spezifischen Stimulation von PBMC durch Peptid C47-6 bei Spender Nr. 2;

Abb. 3 zeigt eine graphische Darstellung der spezifischen Stimulation von PBMC durch Peptid C47-6 bei Spender Nr. 3 und

Tabelle 3 zeigt die HLA-Haplotypassoziation der spezifischen Stimulation von PBMC durch Peptid C47-6 (Auflistung der HLA-Haplotypen von reagierenden Spendern mit Stimulationsindizes HCMV- und Peptid C47-6 stimulierter Kulturen).

2.1. Material und Methoden

2.1.1 Zellisolierung von Blutspendern

Die Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) erfolgte aus buffy coats von gesunden, HLA-typisierten, 9 HCMV-seropositiven und 2 HCMV-seronegativen Blutspendern über Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll (Biochrom, Berlin). Nach der Isolierung wurden die PBMC in Kulturmedium, zusammengesetzt aus RPMI 1640 (Gibco BRL, Eggenstein), 10% humanes HCMV-seronegatives AB-Serum, 2mM L-Glutamin, Penicillin und Streptomycin, resuspendiert.

2.1.2 Antigene

2.1.2.1 Rekombinante HCMV pp65-Subfragmentproteine C74, C35 und C47

Als Antigene zur Groblokalisation von T-Zell-Epitopen innerhalb des Matrixproteins pp65 (Aminosäure 1 — 561) des humanen Cytomegalievirus wurden die drei rekombinant in *Escherichia coli* produzierten, an β -Galaktosidase gebundenen HCMV pp65-Subfragmentproteine C74 (Aminosäure 297 — Aminosäure 458 vom Gesamtprotein pp65), C35 (Aminosäure 303 — Aminosäure 476 vom Gesamtprotein pp65) und C47 (Aminosäure 389 — Aminosäure 561 vom Gesamtprotein pp65) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente β -Galaktosidase vom Klonierungsvektor PEXStuI ohne HCMV-Insert. Diese rekombinanten Proteine wurden von Dr. Werner Lindenmaier, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig zur Verfügung gestellt. Die Expression und Produktion in *Escherichia coli* sowie die gelchromatographische Aufreinigung der drei HCMV pp65-Subfragmentproteine C74, C35, C47 und des Kontrollproteins β -Galaktosidase erfolgte nach Lindenmaier, W. et al. (25), Archives of Virology 113, 1—16, 1990). In Folge wurden die Fraktionen durch Gelelektrophorese analysiert, HCMV pp65-Subfragmentprotein enthaltende Fraktionen gepoolt und die Proteinkonzentration bestimmt.

2.1.2.2 Hexadecapeptide, abgeleitet aus der Aminosäuresequenz des HCMV pp65-Subfragmentproteins C47

Um die Aminosäuresequenz innerhalb des HCMV pp65-Subfragmentproteins C47, die eine Proliferation peripherer mononukleärer Blutzellen HCMV-seropositiver Blutspender induzierte, näher einzugrenzen, wurden 10 je 8 Aminosäuren (= aa) mit dem folgenden Peptid überlappende Hexadecapeptide (C47-1 bis C47-10 : 1. aa 469 — aa 484; 2. aa 477 — aa 492; 3. aa 485 — aa 500; 4. aa 493 — 508; 5. aa 501 — aa 516; 6. aa 509 — aa 524; 7. aa 517 — aa 532; 8. aa 525 — aa 540; 9. aa 533 — aa 548; 10. aa 541 — aa 556) und ein Tridecapeptid (C47-11 : aa 549 — aa 561), das eine 8 Aminosäuren überlappende Sequenz mit dem vorhergehenden Peptid C47-10 besitzt, aus der Gesamtsequenz des HCMV pp65-Proteins (aa 1 — aa 561) abgeleitet und synthetisch hergestellt. Der Anfang von Peptid C47-1 wurde derartig gewählt, daß die ersten 8 Aminosäuren (aa 469 — aa 476) vor dem Beginn der

ausschließlich vom HCMV pp65-Subfragmentprotein C47 abgedeckten Sequenz, beginnend ab aa 477, liegen.

Die Peptide wurden chemisch mit einem AMS 222 Multiple Synthesizer (ABIMED Analysen-Technik, Langenfeld) nach einem standardisierten Fmoc/tert-Butyl-Verfahren durch Aktivierung mit TBTU/NMM (O-benzotriazolyl-N,N,N',N'-Tetramethyluronium Terafluoroborat/N-methyl-Morpholin) auf Tentagel-SAC Resin (Rapp Polymere, Tübingen) von Ronald Frank, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig synthetisiert. Folgend wurden die Peptidketten entschützt und vom Resin mit Trifluoressigsäure (TFA)/2% Triisobutylsilan und 3% H₂O gespalten. Die Präzipitation erfolgte in kaltem Äther. Die Rohpeptide wurden durch präparative HPLC mit einer Reversed-phase C₁₈-Säule gereinigt, wobei ein Acetonitril/Wasser-Gradient mit 0,1% TFA eingesetzt wurde. Der Peptid-Gehalt der Fraktionen wurde durch analytische Reversed-phase HPLC und mit Laserdesorptionmassenspektrometrie (MALDI-MS) analysiert. Reine Peptidfraktionen wurden gepoolt, konzentriert und lyophilisiert.

Anschließend wurden die Peptide mit einer Stammkonzentration von 2 mg/ml in PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung) gelöst.

2.1.2.3 HCMV-Antigen

Als Positivkontrolle wurde HCMV-Gesamtantigen, Stamm AD169 des humanen Cytomegalievirus eingesetzt. Hierfür wurden subkonfluente Monolayer von diploiden MRC-5-Fibroblasten mit dem Stamm HCMV AD169 infiziert, bis ein zytopathischer Effekt von 100% zu beobachten war. Die infizierten Zellen wurden gewaschen, in RPMI ohne Serum aufgenommen und zum Zellaufschluß drei Mal eingefroren und aufgetaut. Das Lysat wurde zentrifugiert (5000 × g, 20 min, 40°C) und der resultierende Virus-Überstand in Aliquots bei 700°C gelagert. Vor dem Einsatz im Lymphozytenproliferationstest wurde der in Folge als HCMV-Gesamtantigen benannte Virus-überstand bei 600°C über 45 min inaktiviert. Je nach Viruspräparation erfolgten weitere Verdünnungen von HCMV-Gesamtantigen bis 1 : 10.

2.1.3. Lymphozytenproliferationstest

Für den Lymphozytenproliferationstest wurden 1 × 10⁵ periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC)/100 µl Kulturmedium pro Loch in einer 96-Loch-Rundbodenkulturplatte (NUNC, Wiesbaden, F.R.G.) ausgesät und 100 µl Kulturmedium mit den HCMV pp65-Subfragmentproteinen C74, C35 und C47 bzw. den Hexadecapeptiden C47-1 bis C47-11 als Antigenen zugefügt. Die Konzentration für die HCMV pp65-Subfragmentproteine (MG: pp65 C74 = 137 kD, pp65-C35 = 138 kD, pp65-C47 = 137 kD) lag bei 5 µg/ml Kulturmedium, für die Hexadecapeptide bei 50 µg/ml Kulturmedium. Es wurden drei Negativkontrollen angelegt: Negativkontrolle I. = PBMC + 100 µl Kulturmedium ohne Antigenzusatz; Negativkontrolle II. für die HCMV pp65-Subfragmentproteine = PBMC + 100 µl Kulturmedium mit 5 µg/ml β-Galaktosidase aus *Escherichia coli* mit Klonierungsvektor ohne HCMV-Insert; Negativkontrolle III. für die Hexadecapeptide = PBMC + 100 µl Kulturmedium mit einem 50 µg/ml entsprechenden Volumen PBS. Als Positivkontrolle wurde HCMV-Gesamtantigen eingesetzt. Für jede dieser beschriebenen Behandlungsarten wurden Tripikat- bis Pentaplikatansätze angelegt. Die PBMC wurden bei 370°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Begasung über 6 Tage kultiviert und in den letzten 18 Stunden pro Loch mit 1 MCl [³H]-Methylthymidin/50 µl Kulturmedium ohne Serumzusatz inkubiert (AMERSHAM, Braunschweig). Nach dem Einbau von [³H]-Methylthymidin in Gesamt-DNA proliferierender Zellen erfolgte die Ernte auf Glasfaserfilter und eine Flüssigkeitsszintillationszählung der counts pro Minute im β-Counter.

Der Einbau von [³H]-Methylthymidin als counts pro Minute (cpm) wurde wie folgt angegeben: entweder sind die Mittelwerte der cpm ± Standardfehler (SEM) angegeben oder es erfolgte die Berechnung der Stimulationsindizes (SI) ausgedrückt als Verhältnis der cpm-Mittelwerte von PBMC-Kulturen mit Antigen-Behandlung zu den cpm-Mittelwerten unbehandelter Kontrollkulturen.

2.2. Eigene Ergebnisse

2.2.1. Spezifische Stimulation peripherer mononukleärer Blutzellen gesunder, HCMV-seropositiver Blutspender durch das HCMV pp65-Subfragmentprotein C47

Die antigenspezifische Erkennung durch Inkubation von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) von 11 gesunden Blutspendern mit den HCMV pp65-Subfragmentproteinen C74, C35 und C47 sowie dem Kontrollprotein β-Galaktosidase (β-gal) vom Klonierungsvektor PEXStuI ohne HCMV-Insert wurde im Lymphozytenproliferationstest mittels Einbau von [³H]-Methylthymidin in die Gesamt-DNA proliferierender peripherer mononukleärer Blutzellen getestet (Tabelle 1).

Von diesen 11 gesunden Spendern waren 9 HCMV-seropositiv und 2 HCMV-seronegativ. Bei 7 von 9 HCMV-seropositiven und 2 von 2 HCMV-seronegativen Spendern konnten die Haplotypen der HLA-Klasse I determiniert werden. Hierbei differierten die Haplotypen der HLA-Klasse I. Bei 8 von 9 HCMV-seropositiven und 2 von 2 HCMV-seronegativen Spendern konnten die Haplotypen der HLA Klasse II determiniert werden. 8 von 9 HCMV-seropositiven und 2 von 2 HCMV-seronegativen Individuen exprimierten gemeinsam die Superspezifität HLA-DR3 und die Superspezifität HLA-DQ2.

Die Untersuchungen ergaben, daß bei 6 von 9 HCMV-seropositiven Spendern (Nr. 1 — 6) das HCMV pp65-Subfragmentprotein C47 eine spezifische Stimulation der Proliferation peripherer mononukleärer Zellen induziert. Der Medianwert der Stimulationsindizes dieser 6 auf das HCMV pp65-Subfragmentprotein C47 reagierenden Individuen lag bei 13,6 (maximal: 67,9 und minimal: 3,6). Die zwei weiteren HCMV pp65-Subfrag-

mentproteine C74 und C35 konnten bei den Spendern Nr. 1 — 6 keine Proliferation von PBMC induzieren. Die PBMC von 3 von 9 HCMV-seropositiven (Nr. 7 — 9) und 2 von 2 HCMV-seronegativen Spendern (Nr. 10 — 11) wurden von keinem der drei HCMV pp65-Subfragmentproteine stimuliert. Zwei von diesen 3 Individuen (Nr. 7 und 8) wiesen jedoch eine HCMV-spezifische Stimulation gegen HCMV-Gesamtantigen auf und einer dieser drei Spender reagierte weder auf HCMV-Gesamtantigen noch auf die drei HCMV pp65-Subfragmentproteine. Als Negativkontrolle reagierten 2 HCMV-seronegative Individuen (Nr. 10 und 11) weder auf die drei HCMV pp65-Subfragmentproteine noch auf das HCMV-Gesamtantigen.

Daraus wird gefolgert, daß von peripheren mononukleären Blutzellen HLA-DR3/DQ2 exprimierender, HCMV-seropositiver Blutspender eine Aminosäuresequenz innerhalb des HCMV pp65-Subfragmentproteins C47 erkannt wird und diese Zellen dadurch zur Proliferation stimuliert werden. Diese Aminosäuresequenz liegt innerhalb des Bereiches des HCMV pp65-Subfragmentproteins C47 (ab Aminosäure 477 bis einschließlich Aminosäure 561), der sich nicht mit den zwei weiteren HCMV pp65-Subfragmentproteinen C74 (ab Aminosäure 297 bis einschließlich Aminosäure 458) und C35 (ab Aminosäure 303 bis einschließlich Aminosäure 476) überschneidet. Die beiden HCMV pp65-Subfragmentproteine C74 und C35 konnten keine Stimulation der Proliferation induzieren. Somit wurde die Groblokalisation eines T-Zell-Epitopes innerhalb des HCMV pp65-Subfragmentproteins C47 durchgeführt.

2.2.2. Spezifische Stimulation peripherer mononukleärer Blutzellen gesunder, HCMV-seropositiver Blutspender durch synthetisch hergestellte, aus der Aminosäuresequenz vom HCMV pp65-Subfragmentprotein C47 abgeleiteter Peptide

Die antigenspezifische Erkennung durch Inkubation von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) von gesunden Blutspendern mit den Peptiden C47-1 bis C47-11 wurde wiederum im Lymphozytenproliferationstest mittels Einbau von [³H]-Methylthymidin in Gesamt-DNA proliferierender peripherer mononukleärer Blutzellen untersucht.

In Tabelle 2 wurde die erfindungsgemäße Wirkung derart gezeigt, daß PBMC von drei HCMV-seropositiven Spendern (Nr. 1, Nr. 2 und Nr. 3) durch das Peptid C47-6 spezifisch und signifikant zur Proliferation stimuliert wurden. Es ergab sich abhängig vom Individuum ein Stimulationsindex von 6,0 für Spender Nr. 1, ein Stimulationsindex von 74,6 für Spender Nr. 2 und ein Stimulationsindex von 20,1 für Spender Nr. 3. Die dem Peptid C47-6 benachbarten und mit diesem je 8 Aminosäuren überlappenden Peptide C47-5 und C47-7 wie auch die Peptide C47-1, -2, -3, -4, -8, -9, -10, -11 konnten keine signifikante Stimulation der Proliferation von PBMC der drei Spender induzieren. Abb. 1 zeigt die graphische Darstellung der spezifischen Stimulation von PBMC durch Peptid C47-6 bei Spender Nr. 1, Abb. 2 die graphische Darstellung der spezifischen Stimulation von PBMC durch Peptid C47-6 bei Spender Nr. 2 und Abb. 3 die graphische Darstellung der spezifischen Stimulation von PBMC durch Peptid C47-6 bei Spender Nr. 3.

Erfindungsgemäß wurde somit die immunogene Sequenz eines T-Zell-Epitopes innerhalb des pp65-Proteins von HCMV durch die spezifische Stimulation peripherer mononukleärer Blutzellen gesunder, HCMV-seropositiver Spender mit dem Peptid C47-6 identifiziert und auf eine kleine Sequenz von 16 Aminosäuren beginnend ab Aminosäure 509 bis einschließlich Aminosäure 524 vom pp65-Protein des humanen Cytomegalievirus eingegrenzt.

Erfindungsgemäß wurde weiterhin in Tabelle 3 gezeigt, daß drei auf das Peptid C47-6 reagierende Spender Nr. 1, 2 und 3 folgende gemeinsame HLA-Haplotypmerkmale aufweisen: HLA-A1, HLA-B8, HLA-DR3 und HLA-DQ2. Der HCMV-seronegative Spender Nr. 11 wies keine Stimulation sowohl durch HCMV-Gesamtantigen als auch durch Peptid C47-6 auf.

Tabelle 1: Spezifische Stimulation peripherer mononukleärer Blutzellen durch das HCMV pp65-Subfragmentprotein C47

Spender Nr.	HCMV- Serostatus	HLA-Haplotypen							Stimulationsindizes von			
		A	B	Cw	DR	DQ	DRw	HCMV	β-gal	β-gal pp65 Subfragmentproteine		
										C74	C35	C47
1	+	1,3	8,35	4	1,3	1,2	52	23,3	2,1	2,2	1,0	18,3
2	-	1,3	8,49	7	3,4	2,8	52,53	52,9	1,7	5,6	5,7	67,9
3	+	1,26	8,27	1,7	1,3	1,2	52	9,3	2,7	2,7	2,2	6,5
4	+	11,28	8,18	7	2,3	1,2	51,52	6,7	1,6	1,6	1,7	3,6
5	+	1,2	8,44	5,7	3,4	2,3	52,53	11,2	3,1	1,3	2,4	8,8
6	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	32,7	4,2	2,1	1,6	22,1
7	+	1,2	8,18	2,7	2,3	1,2	51,52	5,1	3,0	3,7	2,3	2,8
8	+	ND	ND	ND	3,7	2	52,53	18,5	3,6	3,0	2,7	3,9
9	+	2	18,44	5,7	2,3	1,2	51,52	0,8	1,3	1,4	1,3	0,7
10	-	2,26	13,37	6	3,14	1,2	52	0,7	1,0	1,5	1,3	1,4
11	-	1,2	7,60	3,7	2,3	1,2	51,52	0,9	1,0	0,9	1,5	1,0

Tabelle 2

Spezifische Stimulation peripherer mononukleärer Blutzellen durch Peptid C47-6 bei den Spendern Nr. 1, 2 und 3

Antigen	Stimulation: Mittelwerte der cpm \pm Standardfehler		
	Spender Nr.1	Spender Nr.2	Spender Nr.3
Peptid C47-1 (50 μ g/ml)	4715 \pm 1470	1652 \pm 617	2938 \pm 255
Peptid C47-2 (50 μ g/ml)	6532 \pm 1354	1707 \pm 317	2667 \pm 125
Peptid C47-3 (50 μ g/ml)	2705 \pm 647	1388 \pm 203	2293
Peptid C47-4 (50 μ g/ml)	2828 \pm 271	1510 \pm 117	4034 \pm 394
Peptid C47-5 (50 μ g/ml)	1645 \pm 152	1378 \pm 128	3674 \pm 955
Peptid C47-6 (50 μ g/ml)	32631 \pm 6236	135243 \pm 3680	82937 \pm 14433
Peptid C47-7 (50 μ g/ml)	13797 \pm 2926	2407 \pm 551	11977 \pm 3353
Peptid C47-8 (50 μ g/ml)	2286 \pm 365	1378 \pm 128	3863 \pm 1053
Peptid C47-9 (50 μ g/ml)	4837 \pm 2280	691 \pm 44	2519 \pm 232
Peptid C47-10 (50 μ g/ml)	4861 \pm 2285	1637 \pm 56	3624 \pm 852
Peptid C47-11 (50 μ g/ml)	3738 \pm 638	1231 \pm 110	5554 \pm 1496
Subfragmentprotein C47 (5 μ g/ml)	15887	89388 \pm 9658	25368 \pm 3401
Mediumkontrolle	5420 \pm 1057	1812 \pm 44	4118 \pm 697
HCMV	15769 \pm 3501	41313 \pm 2214	35152 \pm 3795

Tabelle 3

HLA-Haplotypassoziation der spezifischen Stimulation von peripheren mononukleären Blutzellen durch Peptid C47-6 (12,5 µg/ml)

Spender Nr.	HCMV- Serostatus	HLA-Haplotypen				Stimulationindizes von	
		A	B	DR	DQ	HCMV	Peptid C47-6
1	+	1,3	8,35	1,3	1,2	14,2	18,8
2	+	1,3	8,49	3,4	2,8	24,5	75,1
3	+	1,26	8,27	1,3	1,2	19,6	28,2
11	-	1,2	7,60	2,3	1,2	0,6	1,3

Patentansprüche

1. Hexadekames Peptid der folgenden Sequenz:

KYCEFFWDANDIYRIF

oder ein Teil desselben (Teilpeptid), wobei dem Teilpeptid gegenüber dem Peptid C-terminal oder N-terminal 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 oder 8 Aminosäuren oder unter Deletion des C-Terminus und des N-Terminus insgesamt 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 oder 8 Aminosäuren fehlen können.

2. Vakzine gegen das Human-Cytomegalievirus (HCMV), gekennzeichnet durch einen Gehalt an dem Peptid und/oder einem Teil desselben (Teilpeptid) gemäß Anspruch 1.

3. Vakzine nach Anspruch 2 für Individuen mit den HLA-Klassen I und II (Haplotypen HLA-A1, HLA-B8, HLA-DR3 und HLA-DQ2).

4. Verwendung eines Peptids oder Teilpeptids gemäß Anspruch 1 zur Gewinnung von T-Zellen, die durch das Peptid und/oder Teilpeptid spezifisch vermehrt werden, dadurch gekennzeichnet, daß man

- mononukleäre Zellen von allogenen oder autologen Spendern einsetzt,
- daraus T-Zellen mit dem Peptid und/oder Teilpeptid stimuliert,
- danach T-Zellen anzüchtet und vermehrt, die für das Peptid und/oder Teilpeptid spezifisch sind,
- T-Zellen gewinnt, die für das Peptid und/oder Teilpeptid spezifisch sind, und
- ggf. die gewonnenen T-Zellen im Sinne einer adoptiven Immuntherapie einer HCMV-Infektion einsetzt.

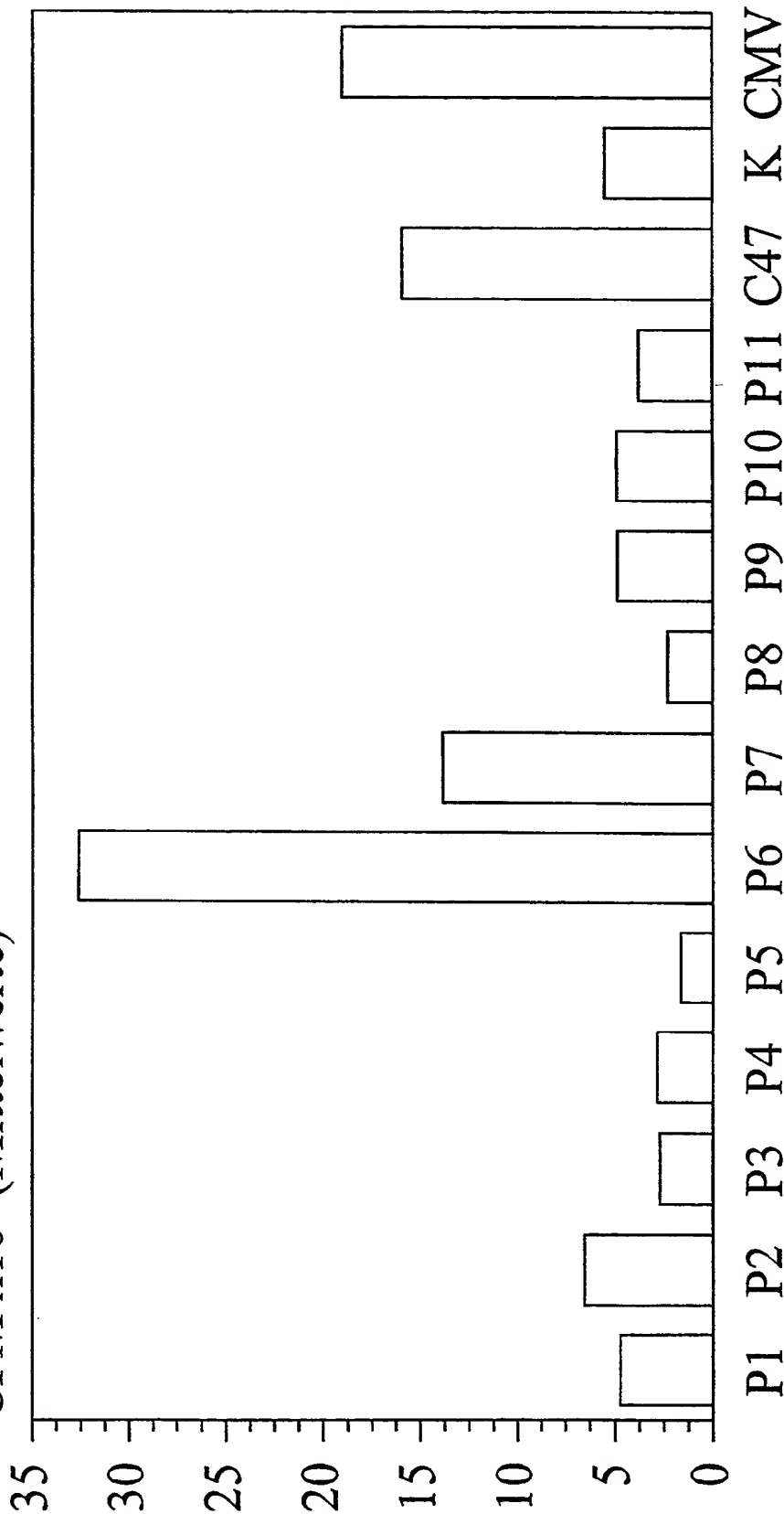
5. Ex-vivo-Verwendung eines Peptids und/oder Teilpeptids gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2 zur diagnostischen Bestimmung einer HCMV-spezifischen Immunreaktivität.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

Abb. 1: Spezifische Stimulation durch HCMV-Peptid C47-6

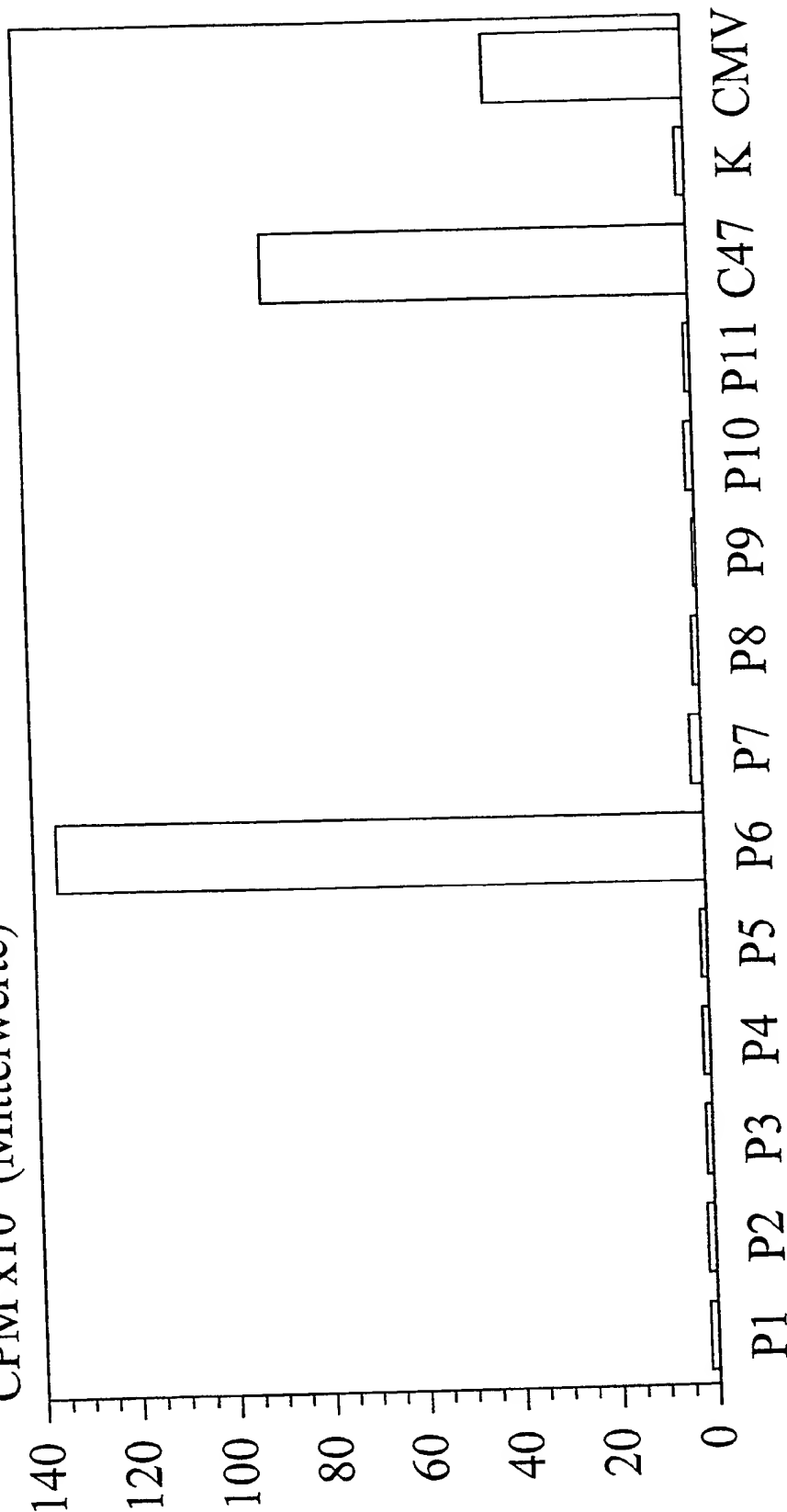
HLA-Haplotyp von Spender Nr. 1: A 1,3; B 8,35; DR 1,3; DQ 1,2

CPM x 10³ (Mittelwerte)



Peptide P1 - P11 (50 µg/ml) von der C47 Sequenz, C47 (5 µg/ml), K = Kontrolle, CMV

Abb. 2: Spezifische Stimulation durch HCMV-Peptide C47-6
HLA-Haplotyp von Spender Nr. 2: A 1,3; B 8,49; DR 3,4; DQ 2,8
CPM x 10³ (Mittelwerte)



Peptide P1 - P11 (50 µg/ml) von der C47 Sequenz, C47 (5 µg/ml), K = Kontrolle, CMV

Abb. 3: Spezifische Stimulation durch HCMV-Peptid C47-6
 HLA-Haplotyp von Spender Nr. 3: A 1,26; B 8,27; DR 1,3; DQ 1,2
 CPM x 10³ (Mittelwerte)

